

Innere Haarzellen – zelluläre Grundlagen der Schallkodierung

Alexander Meyer¹, Thomas Frank¹, Darina Khimich¹, Dietmar Riedel², Benjamin Harke³, Stefan Hell³, Yuri M Yarin^{1,4} und Tobias Moser¹

(1) Innenohrlabor der HNO-Klinik der Universitätsmedizin Göttingen, 37099 Göttingen

(2) Labor für Elektronenmikroskopie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, 37077 Göttingen

(3) Abteilung NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, 37077 Göttingen

(4) HNO-Klinik der TU Dresden, 01307 Dresden

Schlüsselwörter: Tonotopie, Innere Haarzellen, Synapse, STED-Mikroskopie

Einleitung

Schallsignale, die die Cochlea nach Passage der Strukturen des äußeren Ohres und des Mittelohres erreichen, werden hier von den inneren Haarzellen mit hoher zeitlicher Präzision in neuronale Informationen umgewandelt. Eine Schlüsselstelle stellen hierbei die afferenten Synapsen der inneren Haarzellen (IHC) dar, die zu den Bändersynapsen (engl. *Ribbon synapses*) zählen (Nouvian et al., 2006). Eine innere Haarzelle überträgt Signale in Form des Neurotransmitters Glutamat an afferente Fasern mehrerer Spiralganglienneurone. Die Übertragungseigenschaften dieser Verbindung bestimmen dabei die Verarbeitung der akustischen Information (Fuchs, 2005).

Es war eine bislang weitgehend offene Frage, wie die Übertragungseigenschaften der afferenten Synapse für eine optimale Schallwahrnehmung justiert werden. Dabei zeigten erste Arbeiten, dass neben der tonotopen Organisation der Cochlea offenbar Unterschiede in der Innervationsdichte in verschiedenen Bereichen eine Rolle spielen (Lieberman et al., 1990; Slepecky et al., 2000). Darüber hinaus zeigen afferente Fasern aus einem definierten tonotopen Bereich eine große Variabilität in ihrer Spontanentladungsfrequenz und Empfindlichkeit für Schallsignale (Taberner and Liberman, 2005).

Wir zeigen in dieser Arbeit mit Hilfe von optischer konfokaler, 4Pi und STED, sowie Elektronen-Mikroskopie dass die Innervationsdichte innerer Haarzellen eng mit deren Empfindlichkeit im Audiogramm korreliert. Dagegen erscheint die Morphologie der einzelnen Synapsen und deren funktioneller Aufbau relativ invariant.

Material und Methoden

In dieser Studie wurden gerade durch die Kombination einer Reihe von modernen Mikroskopie-Techniken neue Einblicke in die Funktion innerer Haarzellen gewonnen. Einige der hier vorgestellten Methoden sind zum ersten Mal in der Cochlea zur Anwendung gekommen.

Immunfärbungen und konventionelle konfokale Laserscannmikroskopie

Immunfärbungen wurden nach dem im Labor etablierten Standardprotokoll (Khimich et al., 2006) durchgeführt. Kurzgefaßt wurden dabei Cochleae von C57B6 und NMRI Mäusen im Alter von 10 bis 30 Tagen explantiert und in 2% Formaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur oder in 99% Methanol bei -20°C fixiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: Maus anti-CtBP2 (1:200, erkennt auch RIBEYE, BD Bioscience), Kaninchen anti-GluR2/3 (1:200, Chemicon), Kaninchen anti-Ca_v1.3 (1:75, Alomone Labs). Sekundärantikörper: Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 568 (1:200, Molecular Probes). Eine Färbung der Nuclei erfolgte mit Hoechst 34580 (1:1000, Molecular Probes).

Die gefärbten Corti'schen Organe wurden als Ganzes auf einem Objektträger in optisches Medium eingebettet und in einem Leica SP5-Mikroskop untersucht. Auswertungen wurden an Stapelaufnahmen mit einem Schichtabstand zwischen 0,05 und 0,3µm bzw. an Projektionen in z-Achse durchgeführt.

4Pi- und Stimulated-emission-depletion-Mikroskopie

Für Untersuchungen an subzellulären Strukturen innerer Haarzellen wurden neue höchstauflösende Mikroskopietechniken verwendet. STED-Aufnahmen wurden an einem kommerziellen Leica TCS STED mit einer xy-Auflösung von etwa 120-150 nm sowie an einem experimentellen STED-Mikroskop mit einer xy-Auflösung bis 50 nm durchgeführt. Für diese Aufnahmen wurde der Farbstoff Atto647N (1:60, AttoTech) verwendet. 4Pi-Messungen erfolgten an einem experimentellen Mikroskop mit 2-Photonen-Anregung (Auflösung in z-Achse bis 90 nm).

Elektronenmikroskopie

Eine detaillierte Beschreibung der elektronenmikroskopischen Techniken findet sich in dem online verfügbaren Zusatzmaterial zu (Meyer et al., 2009).

Ergebnisse

In einer ersten Serie von Experimenten sollte die Frage beantwortet werden, wie sich die Synapsenzahl – und damit die Innervationsdichte – an verschiedenen tonotopen Lokalisationen der Cochlea verhält. Hierzu wurden Cochleae von NMRI und C57B6-Mäusen (p15-30) präpariert, fixiert und für den präsynaptischen Ribbon und postsynaptische Glutamaterezeptorkanäle gefärbt (Abb. 1, Meyer et al., 2009). Die Anzahl der synaptischen Kontakte pro IHC wurde dann anhand der kolokalisierten prä- und postsynaptischen immunpositiven Punkte gezählt. Anhand des Abstandes zum Apex war eine Lokalisation der entsprechenden Zelle und mittels publizierten tonotopen Karten (Müller, 1996) eine Zuordnung zu der entsprechenden charakteristischen Frequenz möglich. Die daraus resultierende Synapsendichteverteilung, gleichbedeutend mit der cochleären afferenten Innervationsdichte ist in Abbildung 1 dargestellt. Diese beschreibt einen parabelförmigen Verlauf mit einem Maximum im Bereich der mittleren Frequenzen (12-24 kHz, etwa 17 Synapsen pro IHC), während an den Grenzen des für das Tier hörbaren Spektrums die Synapsendichte auf unter 7 abfällt).

Um nun die Innervationsdichte in Relation zur Empfindlichkeit des Hörens zu setzen haben wir in den gleichen Tieren ERA-Messungen durchgeführt und so die Hörschwellen bestimmt. Die Ergebnisse finden sich ebenfalls in Abbildung 1. Danach decken sich Innervationsdichte und Hörschwelle praktisch über das gesamte hörbare Spektrum.

Es kann somit festgestellt werden, dass die Innervationsdichte sehr genau an die jeweilige frequenzspezifische Empfindlichkeit angepasst ist, die selbst wiederum aus den Übertragungseigenschaften des gesamten Hörapparates, das heißt v. a. auch des Mittelohres resultiert.

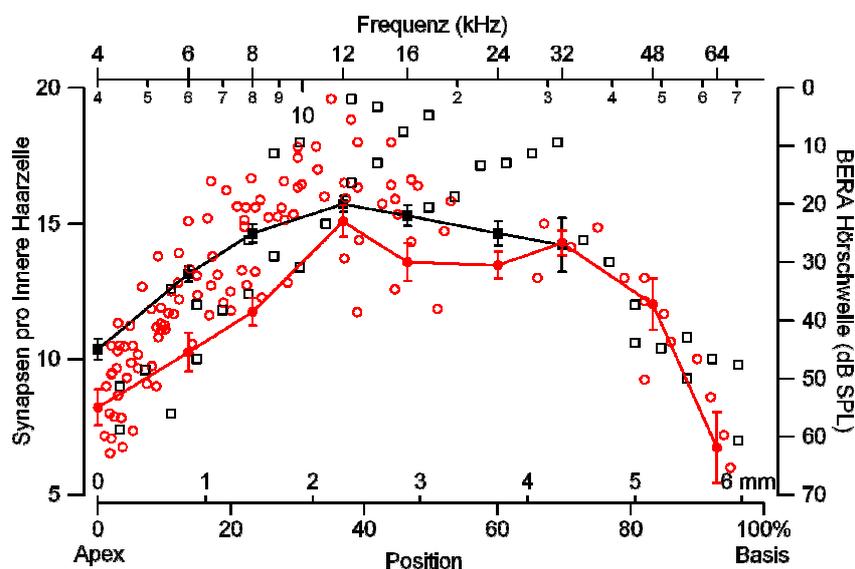


Abbildung 1: Synapsendichte und ERA-Hörschwelle korrelieren über die gesamte tonotopische Achse. Abgebildet ist die mittlere Anzahl an Synapsen pro innerer Haarzelle in NMRI (p15-20, offene rote Kreise) und C57B6 (p30, offene schwarze Quadrate) Mäusen entlang der gesamten Cochlea. Gefüllte Symbole zeigen die mittlere ERA-Hörschwelle in den gleichen Tieren (in dB SPL).

Dieser Befund gibt Anlaß zu der Frage, ob der Aufbau der einzelnen Synapsen selbst über die tonotopische Achse variiert. Wir führten hierzu elektronenmikroskopische Untersuchungen an zwei verschiedenen Lokalisationen, im apikalen sowie im mittleren Bereich der Cochlea durch. Vermessen wurde die Größe des Ribbons, die Zahl und Größe der angehefteten Vesikel sowie die Größe der postsynaptischen Dichte. In allen untersuchten Parametern fanden wir keinen Hinweis auf eine Variabilität entlang der tonotopischen Achse. Einzig erscheint die Zahl der nicht unmittelbar an einen Ribbon angehefteten Vesikel in den IHC im apikalen Bereich höher zu sein.

Um nun über die rein elektronen-morphologischen Merkmale hinaus eine Aussage der funktionellen Elemente treffen zu können, führten wir Immunfluoreszenzfärbungen für synaptische Proteine von verschiedenen Stellen der Synapse durch. Dabei ergab sich das Problem, dass die funktionellen Elemente der Synapsen sich in einer Größenordnung nahe der Auflösungsgrenze konventioneller konfokaler Mikroskopie bewegen. Es war daher notwendig, die neuen höchstauflösenden mikroskopischen Techniken STED und 4Pi (Hell, 2009) mit einem Auflösungsvermögen zwischen 50 und 150 nm zur Abbildung zu verwenden.

Drei synaptische Elemente wurden untersucht: Der Ribbon als zentrale Struktur der Präsynapse, präsynaptische Calcium-Kanal-Cluster als wesentliche funktionelle Elemente zur Initiierung der

Transmitterfreisetzung sowie schließlich die Glutamatrezeptor-Cluster als essentielle funktionelle Einheit der Postsynapse. Die Aufnahmen im Einzelnen finden sich in Abb. 3, Meyer et al., 2009.

Ribbons haben eine längsovale Fluoreszenzsignatur, deren lange Achse bei apikalen Haarzellen im Mittel 379 ± 62 nm, bei denen in der mittleren Cochlea 357 ± 63 nm beträgt. Die Größe liegt dabei deutlich oberhalb der Punktspreizfunktion des STED-Mikroskops von etwa 150 nm, so dass die Ribbons mit dieser Methode exakt quantifiziert werden können.

Calciumkanal-Cluster lassen sich ebenfalls mit der STED-Mikroskopie abbilden. Auch hier findet sich eine längsovale Struktur mit einer mittleren langen Achse von 327 ± 95 nm apikal und 320 ± 97 nm mitt-cochleär. Die hohe STED-Auflösung ermöglicht hier erstmals, dicht benachbarte Cluster optisch zu trennen. Die Verteilung der Cluster liegt oberhalb der Punktspreizfunktion, reicht jedoch mit den kleinsten Objekten dicht an die Auflösungsgrenze von etwa 150 nm heran.

Den größten Auflösungs Vorteil liefert STED in Abbildungen der postsynaptischen AMPA-Rezeptor-Cluster. Bereits in der konventionellen konfokalen Mikroskopie sind diese als ringförmige Strukturen zu erkennen. Wir führten eine 3D-STED-Aufnahme von den Rezeptorclustern durch, die ein hochauflösendes räumliches Bild dieser Struktur lieferte (Abbildung 2). Der Ring misst in apikalen Synapsen 884 ± 15 nm sowie in mitt-cochleären 751 ± 11 nm im Durchmesser. Der Unterschied ist ($n = 16$ bzw. 19 vermessene Strukturen) statistisch signifikant.

Insgesamt ergibt sich somit das Bild eines relativ einheitlichen strukturellen Aufbaus der Synapsen entlang der tonotopen Achse der Cochlea. Die gemessenen Abweichungen in der Größe einzelner Strukturen sind, so denn statistisch signifikant, jedoch in absoluten Zahlen gering.

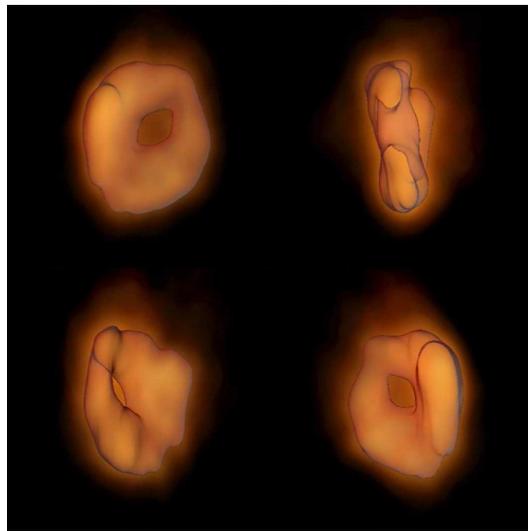


Abbildung 2: Postsynaptische Glutamatrezeptorcluster haben eine Ringstruktur und umgeben den präsynaptischen Ribbon. Die Abbildung zeigt die Rekonstruktion eines postsynaptischen Glutamatrezeptorclusters aus einer 3D-Stapel Aufnahme in STED-Technik. Die Auflösung in allen drei Raumrichtungen liegt bei etwa 150 nm.

Zusammenfassung und Diskussion

Die inneren Haarzellen der Cochlea stellen den Ort der Umwandlung von akustischen Schwingungen in Nervenimpulse dar. Die afferente Synapse am basalen Pol der inneren Haarzelle, ist somit von zentraler Bedeutung für die Kodierung akustischer Information. Wir haben mit morphologischen und physiologischen Techniken ihre Funktion an verschiedenen Stellen entlang der tonotopen Achse der Cochlea untersucht. Dabei fanden wir, dass die Zahl der synaptischen Kontakte zu den nachgeschalteten Neuronen des Spiralganglions gerade in dem tonotopen Bereich der Cochlea maximal ist, der die höchste Lautstärkeempfindlichkeit aufweist. Mit hochauflösenden optischen Techniken (STED- und 4Pi-Mikroskopie) konnten wir zeigen, dass die Ausstattung der Synapsen mit präsynaptischen Calciumkanälen sowie postsynaptischen Glutamatrezeptoren entlang der tonotopen Achse kaum variiert.

Die Anwendung von lichtmikroskopischen Verfahren an vollständig präparierten und immungefärbten Corti'schen Organen ermöglichte es uns erstmals, die Synapsenzahl entlang der tonotopen Achse ortsaufgelöst und mit hoher Stichprobengröße zu vermessen. Das daraus resultierende Cochleogramm basiert auf Messung von mehr als 15.000 Synapsen in der Maus und mehr als 10.000 Synapsen in der Wüstenrennmaus und geht damit in seiner Genauigkeit über elektronenmikroskopische Studien (Lieberman, 1982; Tsuji and Lieberman, 1997; Slepecky et al., 2000; Francis et al., 2004) weit hinaus. Die Verlauf der Innervationsdichte folgt dabei dem Audiogramm aus evozierten Potentialen (Abbildung 1) als auch verhaltensexperimentell bestimmten Audiogrammen (Ehret, 1974). Wir halten dies für einen Mechanismus, der in Frequenzbereichen höchster

Empfindlichkeit eine höhere dynamische Auflösung der Schallsignale ermöglicht sowie die Zuverlässigkeit und Präzision der Schallübertragung erhöht.

Mit verschiedenen Techniken haben wir Synapsen in der apikalen sowie der mitt-cochleären Region verglichen. Dabei fanden wir weitgehende Übereinstimmung in der Struktur und der Anordnung der funktionellen Elemente. Ob die beobachteten geringen quantitativen Unterschiede auch eine funktionelle Entsprechung finden, bleibt in künftigen Untersuchungen zu klären.

Literatur

- Ehret G (1974) Age-dependent hearing loss in normal hearing mice. *Naturwissenschaften* 61:506-507.
- Francis HW, Rivas A, Lehar M, Ryugo DK (2004) Two types of afferent terminals innervate cochlear inner hair cells in C57BL/6J mice. *Brain Res* 1016:182-194.
- Fuchs PA (2005) Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse. *J Physiol (Lond)* 566:7-12.
- Hell SW (2009) Microscopy and its focal switch. *Nat Methods* 6:24-32.
- Lieberman MC (1982) The cochlear frequency map for the cat: labeling auditory-nerve fibers of known characteristic frequency. *J Acoust Soc Am* 72:1441-1449.
- Lieberman MC, Dodds LW, Pierce S (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301:443-460.
- Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egner A, Moser T (2009) Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci* 12:444-453.
- Müller M (1996) The cochlear place-frequency map of the adult and developing Mongolian gerbil. *Hear Res* 94:148-156.
- Nouvian R, Beutner D, Parsons TD, Moser T (2006) Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol* 209:153-165.
- Slepecky NB, Galsky MD, Swartzentruber-Martin H, Savage J (2000) Study of afferent nerve terminals and fibers in the gerbil cochlea: distribution by size. *Hear Res* 144:124-134.
- Taberner AM, Liberman MC (2005) Response properties of single auditory nerve fibers in the mouse. *Journal of Neurophysiology* 93:557-569.
- Tsuji J, Liberman MC (1997) Intracellular labeling of auditory nerve fibers in guinea pig: central and peripheral projections. *J Comp Neurol* 381:188-202.